BULLETIN DE LA SOCIÉTÉ DE CHIMIE BIOLOGIQUE.
Extrait du Tome 49, n° 5, 1967, p. 477.

Printed in France.

LES RIBOSOMES D'*ESCHERICHIA COLI*.
II. — PRÉPARATION DE PARTICULES 18S ET 25S PAR TRAITEMENT DES RIBOSOMES AU CHLORURE DE LITHIUM.

par J. MARCOT-QUEIROZ (*) et R. MONIER.

Institut de Chimie biologique, Faculté des Sciences, 13 - Marseille.

(Mémoire reçu le 2 mars 1967).

Résumé. — Le traitement des ribosomes d'*Escherichia coli* par une solution de LiCl 2 M élimine environ 50 p. 100 des protéines ribosomiques et 70-80 p. 100 du RNA 5S, en donnant naissance à des particules sédimentant à environ 18S et 25S. En dialysant les particules resuspendues dans la solution renfermant les protéines solubilisées contre Tris-HCl 5.10^{-3} M, pH 7,4, $MgCl_2$ 10^{-2} M, KCl 0,1 M, on obtient une réassociation des protéines solubilisées et des particules avec formation de produits qui sédimentent à 28S et 47S.

L'association du RNA et des protéines au cours de la formation des ribosomes chez *Escherichia coli* se réalise probablement par étapes successives [1, 2] et l'on a pu proposer l'existence d'une série de précurseurs dont le contenu en protéines va croissant jusqu'à la constitution du ribosome mûr renfermant 63 p. 100 de RNA (**) et 37 p. 100 de protéine [3]. Inversement, l'exposition des ribosomes mûrs à des concentrations élevées d'ions Cs^+ permet, dans des conditions convenables, de détacher une fraction plus ou moins importante des protéines et d'obtenir des

(*) Ce mémoire décrit une partie du travail effectué par Mme J. MARCOT-QUEIROZ en vue de la soutenance d'une Thèse de Doctorat ès-Sciences physiques, soutenue en 1967 à la Faculté des Sciences de Marseille et enregistrée au CNRS sous le n° AO.1412.

(**) *Liste des abréviations.*

RNA	= acide ribonucléique ;
CM	= chloramphénicol ;
RNase	= ribonucléase ;
Tampon TM	= Tris-HCl 5.10^{-2} M, pH 7,4, $MgCl_2$ 10^{-2} M ;
DNase	= désoxyribonucléase.

UNIV. LEIDEN BIBL.

particules dont la teneur en protéine et les coefficients de sédimentation sont inférieurs à ceux des ribosomes. Deux types de ces particules ont été décrits jusqu'à présent. Par sédimentation équilibrée dans le chlorure de cesium, en présence d'ions Mg^{++} 2.10^{-3} M, Meselson et coll. [4] ont obtenu des particules 23S et 42S à 30 p. 100 de protéine. Lerman et coll. [5] de leur côté, en sédimentant complètement les particules résultant de l'action du CsCl, ont réussi à isoler des particules 22S et 28S à 20 p. 100 de protéine seulement, dont ils ont souligné la ressemblance avec les particules accumulées par *E. coli* incubé en présence de chloramphénicol (particules CM) [6]. Dans les deux cas, la transformation des ribosomes en un mélange de particules et de protéines solubles est réversible et l'élimination du CsCl par dialyse permet d'obtenir des ribosomes reconstitués.

Dans le présent mémoire, nous décrivons l'obtention réversible de particules 18S et 25S, ayant quelques analogies avec les particules de Lerman et coll. [5] et les particules CM, par exposition des ribosomes d'*E. coli* au chlorure de lithium 2 M. Une partie des résultats a déjà fait l'objet d'une communication préliminaire [7].

Partie expérimentale.

Souches utilisées et conditions de culture.

La souche ML 308 d'*E. coli* a été utilisée au début de ce travail. Ultérieurement, les expériences ont été reprises avec la souche RNase I^-_{10}, qui représente l'avantage d'être à peu près dépourvue de RNase I [8]. Les deux souches donnant les mêmes résultats, le travail a été poursuivi avec la souche RNase I^-_{10}.

Les cellules sont cultivées dans un fermenteur Biogen (American sterilizer Co, Erie, Pa., USA), récoltées en phase exponentielle de croissance et conservées à —20°, comme précédemment décrit [9].

Les cellules d'*E. coli* ML 308, marquées par ^{14}C dans leur RNA, sont obtenues par culture à 30° sur milieu type 63 [10] renfermant 0,2 pour 100 de glucose et 500 µC/l de 8-^{14}C-adénine ou de 2-^{14}C-uracile (C E A, Saclay, France). Dans tous les cas, les cellules sont récoltées en phase exponentielle de croissance. La croissance est arrêtée brusquement par addition d'un demi volume de glace pilée. Les cellules sont recueillies par centrifugation, lavées une fois par du tampon Tris-HCl 5.10^{-2} M, pH 7,4, $MgCl_2$ 10^{-2} M (Tampon TM) et conservées à —20°.

Préparation des ribosomes.

Sauf indication contraire, toutes les manipulations sont effectuées aux environs de 0°. Le contrôle thermique de la centrifugeuse Spinco est réglé sur 15°F de façon à obtenir en fin de centrifugation une température voisine de 0° à l'intérieur des tubes.

Les cellules (10g) sont suspendues dans du tampon TM de façon à obtenir un volume final de 40 ml. On ajoute à la suspension 100 µg de

DNase (Worthington, Freehold, N.J., U.S.A.) débarrassée de RNase par passage sur DEAE-cellulose [11]. Les bactéries sont ouvertes à l'aide d'une French Pressure cell (Aminco, Silver Spring, Md., U.S.A.) à une pression inférieure à 7 000 psi. Le broyat résultant est débarrassé des débris cellulaires et des cellules intactes par une centrifugation de 10 minutes à 15 000 g. Le surnageant est amené à 96 ml par addition de tampon TM et soumis à une centrifugation d'1 heure à 198 000 g (50 000 t/min dans le rotor 50 de la centrifugeuse préparative Spinco, modèle L). Les surnageants sont éliminés et les culots de ribosomes sont lavés une fois par remise en suspension dans le tampon TM (96 ml) à l'aide d'un homogénéiseur de Potter-Elvejhem à piston de téflon. La suspension est débarrassée des agrégats par une centrifugation de dix minutes à 15 000 g et les ribosomes sont récupérés sous forme de culots par une nouvelle centrifugation à 198 000 g. Les culots sont conservés à —190°C dans un conservateur à azote liquide.

Préalablement au traitement par le chlorure de lithium, les ribosomes sont suspendus dans 96 ml de tampon Tris-HCl 5.10^{-3} M, pH 7,4 $MgCl_2$ 10^{-4} M. La suspension est centrifugée pendant dix minutes à 15 000 g et les ribosomes sont recueillis après sédimentation du surnageant à 198 000 g pendant 3 h.

Préparation des particules.

Les culots de ribosomes ainsi obtenus sont suspendus dans du tampon Tris-HCl 5.10^{-2} M, pH 7,4, $MgCl_2$ 10^{-5} M (5 ml par culot) et centrifugés 10 minutes à 15 000 g. Le surnageant est amené à une concentration 2 M en chlorure de lithium par addition d'1 volume de LiCl 4 M, abandonné une nuit à 0° et centrifugé 5 heures à 198 000 g pour récolter les particules (« particules Li »). Culots et surnageants sont conservés à —190°.

Les « particules K » et les « particules Na » sont obtenues de façon analogue en remplaçant le chlorure de lithium 4 M par KCl ou NaCl à la même concentration.

Fractionnement des ribosomes et des particules.

La séparation des sous-unités ribosomiques 30S et 50S et des particules 18S et 25S est obtenue par sédimentation à 25 000 t/min pendant 15 h dans un gradient linéaire de concentration de saccharose (5 p. 100 - 20 p. 100) dans le tampon Tris-HCl 5.10^{-3} M, pH 7,4, $MgCl_2$ 10^{-4} M, dans le rotor SW 25 de la centrifugeuse Spinco modèle L. Le contenu des tubes est fractionné à l'aide d'un Gradient Fractionnator ISCO (Lincoln, Nebraska, U.S.A.) et les fractions correspondant aux pics de ribosomes ou de particules sont réunies et conservées à —190°.

Préparation des RNAs.

Les RNAs sont obtenus par déprotéinisation au phénol des suspensions de ribosomes ou de particules à 2°C, en présence de 3,5 mg/ml de bentonite. Le mélange phénol-bentonite-suspension est fortement agité pendant 30 minutes. Les deux phases sont séparées par centrifugation à

faible vitesse. La phase aqueuse contenant les RNAs est recueillie et la phase phénolique est lavée deux fois par un demi volume de tampon TM. Toutes les phases aqueuses sont réunies et, après addition de 0,1 volume d'acétate de sodium 20 p. 100 ajustée à pH 5 par de l'acide acétique, les RNAs sont précipités par deux volumes d'éthanol à 95° préalablement refroidi à —10°. Le précipité, recueilli par centrifugation, est dissous dans NaCl 0,15 M et reprécipité par deux volumes d'alcool. Le culot final de RNA est dissous dans NaCl 0,05 M et conservé à —10°.

Recherches de la RNase I dans les ribosomes et les particules.

Cette recherche a été effectuée par incubation à 37° en présence d'éthylène-diamine tétraacétate et mesure des produits acidosolubles apparus selon une technique précédemment décrite [12].

Dosage des protéines et du RNA dans les ribosomes ou les particules.

Les ribosomes ou les particules en suspension dans le tampon TM sont précipités par l'addition d'un volume égal d'acide trichloracétique 10 p. 100 fraîchement préparé. On chauffe au bain-marie à 90° pendant 30 min en agitant de temps à autre. On centrifuge pour séparer le précipité protéique des RNA solubilisés. Le RNA est dosé dans la fraction surnageante par la réaction à l'orcinol [13]. Le culot protéique est lavé une fois dans l'alcool 95 p. 100 et une fois dans le mélange alcool-éther (1:1) puis dissous dans 1 ml de NaOH N. Au bout de 2 heures, on ajuste la concentration de la soude à 0,2 N par addition de 4 ml d'eau et on dose les protéines par la méthode de Lowry et coll. [14].

Détermination spectrophotométrique des ribosomes et du RNA.

On utilise la densité optique mesurée à 260 mμ en admettant qu'à 1 unité de densité optique correspondent 39 μg de RNA.

Fractionnement chromatographique des RNAs.

Les RNAs extraits par déprotéinisation au phénol sont chromatographiés sur colonne de kieselguhr imprégné de sérum albumine méthylée, selon la technique de Mandell et Hershey [15], modifiée par Rosset et coll. [16]. La concentration des différents RNAs est calculée à partir de la mesure de la densité optique à 260 mμ des fractions recueillies.

Analyse chromatographique des protéines extraites des ribosomes et des particules.

Les protéines, préparées par la méthode de Spitnik-Elson [17], ont été fractionnées par chromatographie sur CM-cellulose selon une modification de la technique de Waller [18] : environ 6 mg de protéines sont adsorbées à la température ordinaire sur une colonne de CM-cellulose (0,8 × 20 cm) en présence d'urée 6 M et d'HCl 0,015 N. L'élution est réalisée par un gradient d'HCl obtenu en plaçant dans chacun des 4 premiers compartiments d'un Varigrad Büchler 100 ml d'urée 6 M renfermant les concentrations suivantes d'HCl : 1:0,015 N ; 2:0,035 N ; 3 : 0,035 N ; 4 : 0,1 N.

Mesure des coefficients de sédimentation.

Pour mesurer les coefficients de sédimentation des particules, on leur a ajouté une dose traceuse de ^{14}C-ribosomes 30S ou 50S ou de ^{14}C-RNAs 16S et 23S. Après centrifugation sur gradient de saccharose, la position des marqueurs a été déterminée par comptage de la radioactivité des fractions à l'aide d'un compteur à courant gazeux Tracerlab TGC-14 après précipitation par l'acide trichloracétique et filtration sur filtres Millipore (diamètre des pores : 0,45 µ). La position des particules a été repérée par la densité optique à 260 mµ et leurs coefficients de sédimentation ont été calculés à partir de ceux des marqueurs en supposant une relation linéaire entre le déplacement dans les gradients et le coefficient de sédimentation.

Réassociation des protéines solubilisées et des particules Li.

Toutes les expériences de réassociation ont été effectuées à l'aide de ribosomes préparés à partir de cellules de la souche RNase I^{-}_{10}, pour éviter l'intervention de la RNase I. Un culot de particules Li est resuspendu dans son propre liquide surnageant. La suspension est dialysée pendant 24 h contre 2 × 250 volumes de tampon Tris-HCl 5.10^{-3} M pH 7,4, renfermant les ions alcalins ou divalents dont l'effet sur la réassociation est testée. Une fraction aliquote du contenu du sac à dialyse est additionnée d'une dose traceuse de ^{14}C-ribosomes 30S et immédiatement sédimentée pendant 15 h à 20 000 t/min sur un gradient de concentration de saccharose (5 p. 100 - 20 p. 100) préparé dans le milieu qui a été utilisé pour la dialyse.

Résultats.

Obtention de particules 18S et 25S par traitement des ribosomes au chlorure de lithium 2 M.

Le traitement des ribosomes au chlorure de lithium 2 M dans les conditions décrites dans la partie expérimentale provoque l'apparition de particules, dont le comportement au cours de la centrifugation sur gradient de concentration de saccharose est représenté dans la fig. 1. Dans le cas de la préparation utilisée dans cette expérience, les coefficients de sédimentation des deux particules obtenues étaient exactement 18S et 25S, que ces coefficients aient été mesurés par référence à ceux des RNAs 16S et 23S sur un gradient préparé dans NaCl 0,1 M, acétate de sodium 0,01 M, pH 5,0 (fig. 1, A) ou par référence à celui du ribosome 30S sur un gradient préparé dans le tampon Tris-HCl 5.10^{-3} M, pH 7,4, $MgCl_2$ 10^{-4} M (fig. 1, B). Comme on le verra dans des expériences ultérieures utilisant d'autres préparations, les coefficients de sédimentation varient en fait entre 18S et 19,5S et entre 25S et 28S. Dans la suite de l'exposé, les particules obtenues par traitement au chlorure de lithium seront désignées pour plus de clarté par particule 18S et particule 25S, quelles que soient les valeurs réelles des coefficients de sédimentation dans l'expérience décrite.

Les particules Li utilisées dans les expériences de la fig. 1, A et B, ont été également comparées à des particules accumulées par *E. coli* ML 308 en présence de chloramphénicol sur un milieu renfermant $^{32}PO_4^{\equiv}$. La

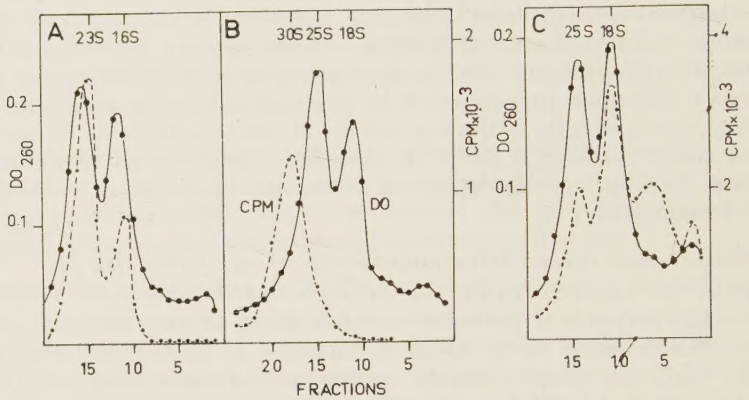

FIG. 1. — *Sédimentation dans un gradient linéaire de concentration de saccharose des particules préparées par traitement des ribosomes d'E. coli ML 308 au chlorure de lithium 2 M.*

A — Comparaison des particules avec les rRNAs 16S et 23S :
Particules (200 µg) additionnées d'une dose traceuse de ^{14}C-RNAs 16S et 23S. Gradient préparé dans NaCl 0,1 M, acétate de sodium 0,01 M pH 5.

B — Comparaison avec les ribosomes 30S :
Particules (200 µg) additionnées d'une dose traceuse de ^{14}C-ribosomes 30S. Gradient préparé dans Tris-HCl 5.10^{-3} M, pH 7,4, $MgCl_2$ 10^{-4} M.

C — Comparaison avec les particules chloramphénicol :
Particules (200 µg) additionnées d'un extrait préparé dans Tris-HCl 10^{-3} M, pH 7,4, $MgCl_2$ 10^{-4} M à partir d'*E. coli ML 308* incubé pendant 40 minutes à 30° sur milieu minimum renfermant 100 µg/ml de chloramphénicol et 82 µC/l de $^{32}PO_4$ HNa_2. Gradient préparé dans Tris-HCl 5.10^{-3} M, pH 7,4, $MgCl_2$ 10^{-4} M.

Sédimentations à 25 000 t/min pendant 15 heures.

TABLEAU I.

Composition en Protéine et RNA de diverses préparations de ribosomes et de particules.

	Protéine (mg)	RNA (mg)	Protéine/RNA
Ribosomes (*)	—	—	0,59
Ribosomes (**)	0,99	1,49	0,66
Particules Li	0,36	1,49	0,24
Particules Na	0,40	1,66	0,24
Particules K	0,45	1,43	0,31
Ribosomes reconstitués (***)	0,45	0,65	0,69

(*) Composition déterminée par TISSIÈRES et coll. [3].

(**) Composition réelle des ribosomes utilisés pour la préparation des différentes particules.

(***) Composition des particules 28S - 47S reconstitués à partir des particules Li et des protéines solubilisées par dialyse contre un tampon Tris-HCl 5.10^{-3} M, pH 7,4, $MgCl_2$ 10^{-2} M, KCl 0,1 M.

fig. 1, C montre que les particules Li et les particules CM ont exactement les mêmes coefficients de sédimentation dans un milieu 10^{-4} M en $MgCl_2$.

Composition globale des particules Li.

La composition en protéines et en RNA d'une préparation typique de particules Li est indiquée dans le Tableau I. Si l'on compare cette composition à la composition des ribosomes d'*E. coli* déterminée par TISSIÈRES et coll. [3], on voit que le traitement au chlorure de lithium enlève environ 50 p. 100 des protéines ribosomiques. En fait, les ribosomes utilisés dans nos expériences ont un rapport protéine/RNA notablement plus élevé que celui qui est admis par ces auteurs, de sorte que la fraction des protéines réellement présentes dans les ribosomes de départ et qui est solubilisée par le traitement est d'environ 64 p. 100.

Comparaison chromatographique entre protéines des particules Li et protéines ribosomiques totales.

Dans le but de comparer les protéines qui restent associées au RNA dans les particules Li, aux protéines totales des ribosomes, des particules Li ont été préparées à partir de ribosomes extraits de cellules cultivées en présence de ^{14}C-amino acides.

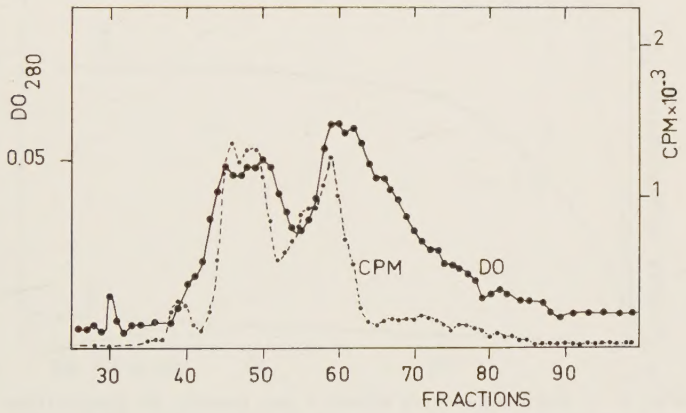

FIG. 2. — *Chromatographie sur CM-cellulose des protéines des ribosomes et des particules Li.*

Environ 6 mg de protéines des ribosomes 70S ont été chromatographiées dans les conditions décrites dans le texte, après addition d'une dose traceuse de ^{14}C-protéines extraites des particules 18S et 25S. Volume des fractions : 2,8 ml. Souche utilisée : *E. coli* ML 308.

Ces particules ont été ajoutées à dose traceuse à une préparation de ribosomes non marqués et les protéines ont été séparées du RNA par la technique de SPITNIK-ELSON [17] puis chromatographiées sur CM-cellulose. La comparaison du profil d'élution de la radioactivité, qui correspond aux protéines des particules Li, et de celui de la densité optique, qui correspond à l'ensemble des protéines ribosomiques (fig. 2) montre

que l'élimination des protéines par le chlorure de lithium 2 M ne s'effectue pas au hasard. Elle porte préférentiellement sur les protéines qui sont le plus difficilement éluées de la CM-cellulose et également sur quelques-unes des protéines à élution rapide.

*Recherche de la RNase I dans les particules Li préparées à partir d'*E. coli *ML 308.*

Les ribosomes préparés à partir de la souche ML 308 renferment de la RNase I, dont la présence peut être mise en évidence par incubation à 37° dans des milieux contenant de l'éthylène diamine tétraacétate. L'activation de la RNase I au cours de cette incubation entraîne la dégradation rapide du RNA ribosomique, et sa transformation en produits acidosolubles (fig. 3, courbe I). L'incubation dans les mêmes conditions des particules Li obtenues à partir des ribosomes de cette souche n'est pas suivie de la formation en quantité importante de produits acidosolubles (fig. 3, courbe II). On peut en conclure que la RNase I est efficacement éliminée des particules au cours du traitement par LiCl 2 M.

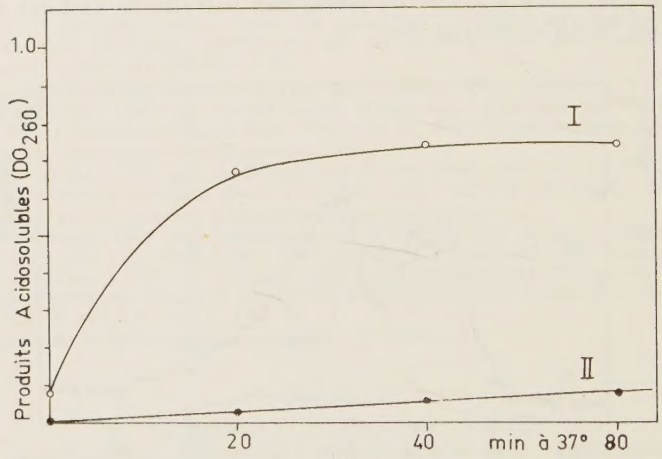

Fig. 3. — *Recherche de la RNase I par mesure de l'apparition de produits acidosolubles au cours de l'incubation dans EDTA.*
I - ribosomes d'*E. coli* ML 308 ;
II - particules Li obtenues à partir de ribosomes d'*E. coli* ML 308.

Nature des RNAs présents dans les particules Li.

La déprotéinisation phénolique des ribosomes 30S et 50S, préparés comme il est indiqué dans la partie expérimentale, libère, en quantités équimoléculaires, du RNA 16S, du RNA 23S et du RNA 5S, ces deux derniers provenant du ribosome 50S, et de petites quantités de t-RNA [16]. Les RNAs de faible poids moléculaire peuvent être séparés des RNAs 16S et 23S par chromatographie sur colonne de kieselguhr imprégné de sérum albumine méthylée [16]. Ils représentent 2,9 p. 100 du RNA total

des ribosomes (Tableau II). Une petite quantité de ces RNAs peut encore être décelée dans les produits obtenus par déprotéinisation des particules Li (fig. 4 - fractions 50 à 60). Cependant, elle ne représente plus dans ce cas, que 0,8 p. 100 du RNA total des particules Li (Tableau II).

TABLEAU II.

Composition en RNAs de faible poids moléculaire de diverses préparations de ribosomes et de particules (en pour cent du RNA total).

Ribosomes	2,9
Particules Li	0,8
Particules Na	2,5
Particules K.....	2,6

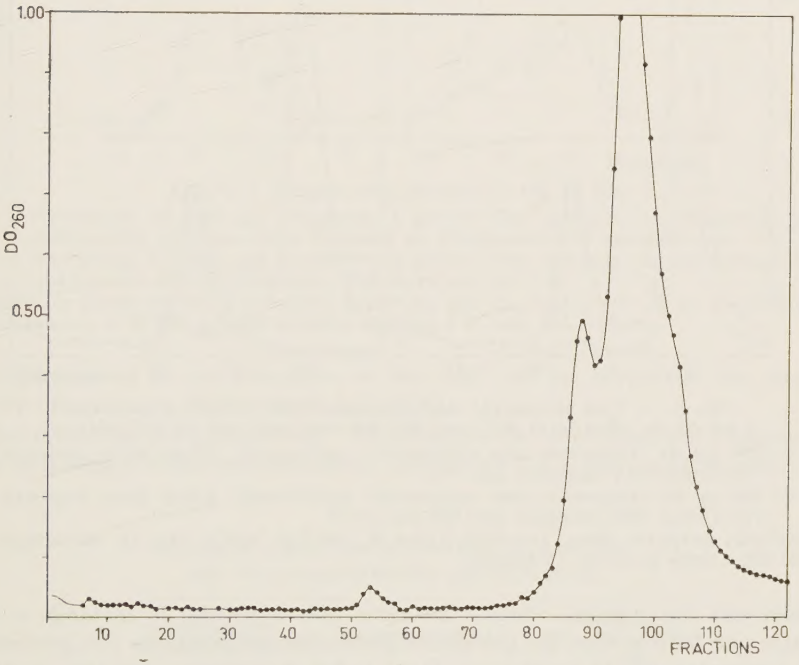

FIG. 4. — *Chromatographie sur sérumalbumine méthylée du RNA extrait des particules Li.*

2,5 mg de RNA extrait des particules Li provenant de la souche RNAase I^{-}_{30} d'*E. coli* ont été chromatographiés. L'élution a été réalisée par un gradient linéaire de concentration de NaCl qui varie entre 0,2 et 1,1 M. Volume des fractions : 2,6 ml

On peut en conclure que 70 p. 100 environ du RNA 5S, qui constitue lui-même 2,4 p. 100 du RNA total des ribosomes 70S, a été perdu par les particules Li. Le RNA perdu par les particules peut être retrouvé dans le

liquide surnageant qui résulte de la préparation des particules Li, après déprotéinisation au phénol. Son élimination des particules ne correspond donc pas à une dégradation.

Origine des particules 18S et 25S.

Pour étudier la filiation entre les ribosomes 30S et 50S et les particules 18S et 25S, des préparations de ribosomes marqués par la ^{14}C-adénine dans leur moitié RNA ont été fractionnées. Les ^{14}C- ribosomes 50S obtenus étaient contaminés par des petites quantités de ^{14}C-ribosomes 30S (fig. 5, A), tandis que les ^{14}C-ribosomes 30S étaient pratiquement purs (fig. 5, B). Des quantités traceuses de ces préparations mar-

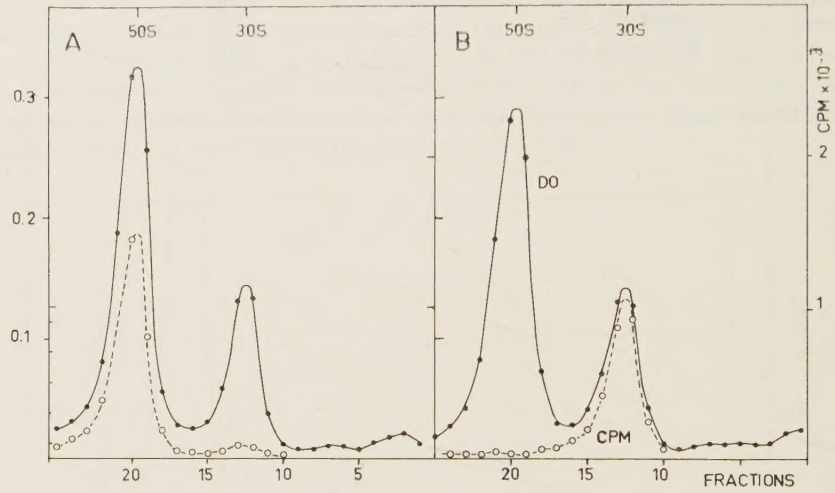

Fig. 5. — *Test de pureté des ribosomes 30S et 50S fractionnés à partir de ribosomes d'E. coli ML 308 marqués par la ^{14}C-adénine.*

A — 200 µg de ribosomes non radioactifs additionnés d'une dose traceuse de ribosomes 50S marqués par ^{14}C.

B — 200 µg de ribosomes non radioactifs additionnés d'une dose traceuse de ribosomes 30S marqués par ^{14}C.

Gradients préparés dans Tris-HCl 5.10^{-3} M, pH 7,4, $MgCl_2$ 10^{-4} M, centrifugés à 21 000 t/min pendant 15 heures.

quées ont été ajoutées à des ribosomes non marqués, le mélange a été traité par LiCl 2 M et les particules produites sédimentées sur gradients de concentration de saccharose. Dans le cas du mélange ^{14}C-50S + ribosomes non marqués, seule la particule 25S renferme une radioactivité notable (fig. 6, A). Par conséquent, le traitement des ribosomes 50S par LiCl 2 M donne naissance exclusivement à des particules 25S. La faible radioactivité observée au niveau des particules 18S dans la fig. 6, A est due à la contamination des ^{14}C-ribosomes 50S par quelques ^{14}C-ribosomes 30S (fig. 5, A). Par contre dans le cas du mélange ^{14}C-30S + ribosomes non marqués, une fraction non négligeable de la radioactivité sédimente avec des coefficients de sédimentation supérieurs à 18S.

L'absence de contamination dans les ribosomes ^{14}C-30S utilisés (fig. 5, B) permet de conclure que le traitement des ribosomes 30S par LiCl 2 M produit principalement des particules 18S accompagnées de petites quantités de particules à coefficients de sédimentation plus élevés.

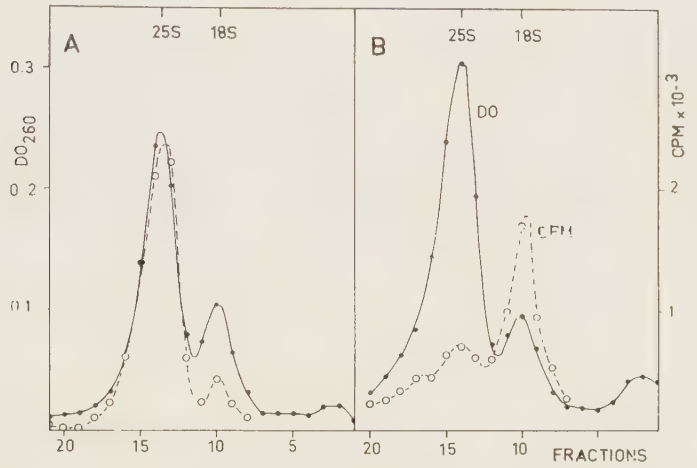

FIG. 6. — *Origine des particules 18S et 25S.*

A — Particules Li (200 µg) préparées à partir d'un mélange de ribosomes non radioactifs et d'une dose traceuse de ribosomes 50S marqués par ^{14}C.

B — Particules Li (200 µg) préparées à partir d'un mélange de ribosomes non radioactifs et des ribosomes 30S marqués par ^{14}C.

Gradients préparés dans Tris-HCl 5.10^{-3} M, pH 7,4, $MgCl_2$ 10^{-4} M et centrifugés 15 heures à 25 000 t/min. Souche utilisée : *E. coli ML 308*.

Influence de la concentration en ions Mg^{++} sur les propriétés des particules obtenues en présence de LiCl 2 M.

Au cours de leurs études sur l'élimination des protéines des ribosomes par exposition à des concentrations élevées de CsCl, MESELSON et coll. [4]

TABLEAU III.

Influence de la concentration en ions Mg^{++} sur les propriétés des particules Li.

Concentration en Mg (**) (M)	Protéine/RNA	Coefficients de sédimentation (*) (S)
10^{-3} (**).....	0,32	18,5 27
5×10^{-3}	0,32	17,5 26
10^{-2}	0,32	18,4 28

(*) Mesurés par sédimentation sur gradient de concentration de saccharose par référence à celui de ribosomes 30S utilisés comme marqueurs.

(**) Concentration minimum réalisable en raison des contaminations présentes dans LiCl utilisé (Lithium Chlorure, pour analyses, B L B, Puteaux France).

ont observé que les résultats obtenus étaient fortement influencés par la concentration en ion Mg^{++}. Au contraire, ainsi que le montre le Tableau III, à des concentrations comprises entre 10^{-3} M et 10^{-2} M, le Mg^{++} n'exerce aucune influence significative sur la composition et le coefficient de sédimentation des particules Li obtenues.

Comparaison entre particules Li, particules K et particules Na.

Le traitement des ribosomes par KCl ou NaCl à la concentration 2 M permet également de préparer des particules à contenu réduit en protéines. Le Tableau I montre que les quantités de protéines éliminées par exposition à ces différents ions alcalins sont voisines. Les particules obtenues ont également des coefficients de sédimentation comparables (fig. 7). Par contre, une différence très nette apparaît au niveau de la

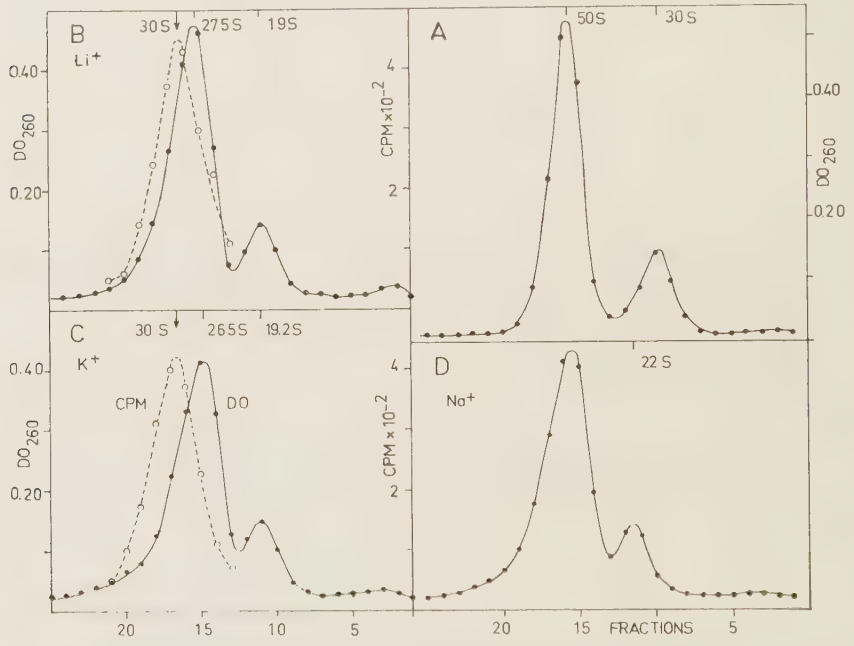

Fig. 7. — *Sédimentation des particules Li, des particules K, des particules Na et des ribosomes non traités.*

A : ribosomes ; B : particules Li ; C : particules K ; D : particules Na. Souche utilisée : *E. coli* RNase I^-_{10}.

Les ribosomes ou les particules (200 µg) ont été sédimentés sur un gradient préparé dans Tris-HCl 5.10^{-3} M, pH 7,4, $MgCl_2$ 10^{-4} M pendant 15 heures à 20 000 t/min (A) ou 25 000 t/min (B, C, D). Les particules étaient additionnées d'une dose traceuse de ribosomes 30S marqués par ^{14}C.

teneur en RNAs de faible poids moléculaire des différentes particules (Tableau II). Il est clair que la teneur des particules K et des particules Na en ces RNAs est peu différente de celle des ribosomes de départ. Par

conséquent, si globalement l'effet de concentrations 2 M en ions Li^+, Na^+ ou K^+ sur la structure des ribosomes apparaît comparable, un effet spécifique de l'ion Li^+ sur l'élimination du RNA 5S est manifeste.

Propriétés associatives des particules 18S et 25S.

Il a été précédemment démontré qu'en présence de concentrations 10^{-2} M en ions Mg^{++} ou en présence de concentrations 0,6 M en ions Li^+ ou Na^+, les RNAs 16S et 23S sont susceptibles de donner des produits d'association, dont l'existence peut être mise en évidence par sédimentation dans des gradients de saccharose [9]. Les diagrammes de sédimentation représentés dans la figure 8 montrent que les particules Li 18S et 25S présentent un comportement analogue. Dans le tampon Tris-HCl, 5.10^{-3} M, pH 7,4, $MgCl_2$ 10^{-4} M, les particules donnent deux pics de sédimentation, mal séparés dans les conditions utilisées (fig. 8, A), tandis que dans le tampon TM, au moins deux pics supplémentaires dont les coefficients de sédimentation sont voisins de 32S et 38S apparaissent.

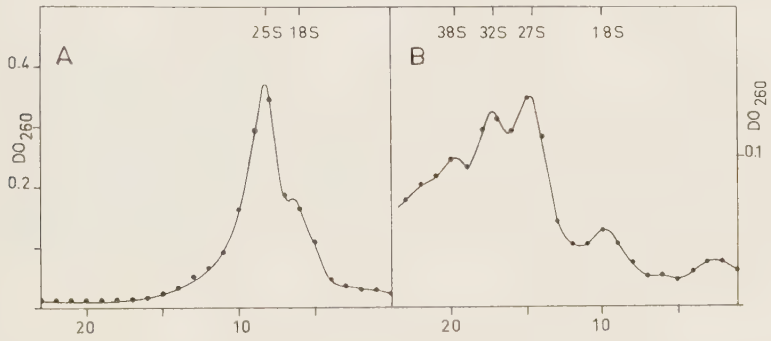

FIG. 8. — *Association des particules 18S et 25S.*

A — Sédimentation de 200 µg de particules Li dans un gradient préparé dans Tris-HCl 5.10^{-3} M, pH 7,4, $MgCl_2$ 10^{-4} M.

B — Sédimentation de 200 µg de particules Li dans un gradient préparé dans Tris-HCl 5.10^{-2} M, pH 7,4, $MgCl_2$ 10^{-2} M.

Gradients centrifugés 15 h à 20 000 t/min.
Souche utilisée : *E. coli* ML 308.

Dans le cas des RNA 16S et 23S, les ions alcalins, dont le rayon ionique est au moins égal à celui de l'ion K^+, exercent un effet antagoniste de celui de l'ion Mg^{++} sur les phénomènes d'association [9]. Les résultats rapportés dans le Tableau IV montrent qu'il en est de même dans le cas des particules Li. Comme précédemment [9], l'influence des cations sur les associations a été déterminée en calculant le pourcentage des particules 18S présentes sous forme associée à partir de la mesure de l'aire du pic des particules 18S libres obtenu par sédimentation dans les différents milieux utilisés. Parmi les cations testés, seuls K^+ et NH^+_4 exercent une influence notable sur le phénomène d'association, tandis que Li^+ ou Na^+ ont peu d'effet.

Les résultats du Tableau IV ont été obtenus en dialysant pendant 6 h des suspensions de particules Li dans le tampon TM contre le même tampon additionné des chlorures des ions testés à la concentration 0,2 M.

TABLEAU IV.

Influence des ions alcalins sur l'association des particules 18S et 25S.

Ion	Pourcentage des particules 18S associées
—	90
Li^+	85
Na^+	87
K^+	61
NH_4^+	61

Les particules Li, suspendues dans le tampon Tris-HCl 5.10^{-2} M, pH 7,4, $MgCl_2$ 10^{-2} M ont été dialysées pendant 6 h contre le même tampon additionné de l'ion indiqué, sous forme chlorure, à la concentration 0,2 M.

En suspendant directement les particules Li dans le milieu de dialyse et en les soumettant immédiatement à la sédimentation sur des gradients préparés dans le même milieu, on observe toujours que l'effet antagoniste des ions K^+ et NH^+_4 est beaucoup moins important. Dans la figure 9 ont été représentés les résultats d'expériences réalisées en présence de concentrations croissantes de KCl, soit après 6 h de dialyse (courbe I), soit après 48 h de dialyse (courbe II). L'effet antagoniste de l'ion K^+,

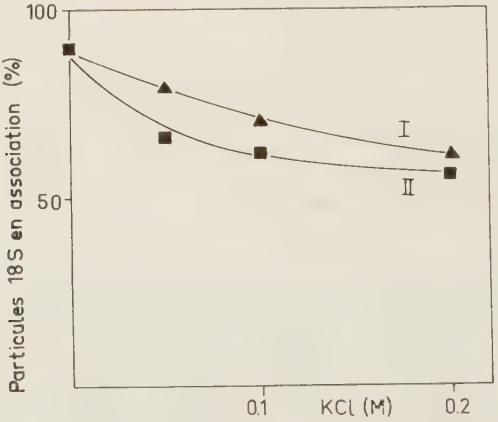

FIG. 9. — *Effet du potassium sur l'association des particules 18S et 25S.*
Pourcentage des particules 18S entrées en association après dialyse contre tampon Tris-HCl 5.10^{-2} M, pH 7,4, $MgCl_2$ 10^{-2} M additionné de KCl à différentes concentrations.
I : durée de la dialyse : 6 h.
II : durée de la dialyse : 48 h.
Souche utilisée : *E. coli* RNase I^-_{10}.

manifeste dès la concentration 0,05 M, est significativement plus marqué dans le deuxième cas que dans le premier.

Réassociation des protéines solubilisées et des particules Li.

Le comportement à la sédimentation en présence d'ions Mg^{++} 10^{-4} M des particules Li utilisées dans les expériences de réassociation est représenté dans la fig. 10, B. A titre de contrôle, la fig. 10, A donne le résultat d'une analyse dans les mêmes conditions des ribosomes à partir desquels ces particules Li ont été préparées.

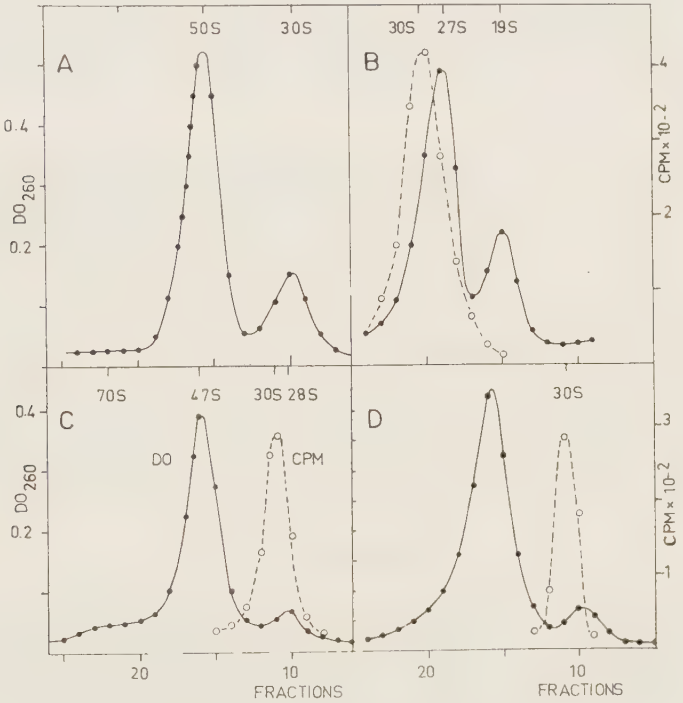

Fig. 10. — *Sédimentation des ribosomes, des particules Li et des ribosomes reconstitués.*

A : Ribosomes (200 µg) ; B : Particules Li (200 µg) ; C : Ribosomes (200 µg) reconstitués par dialyse des particules Li resuspendues dans le surnageant résultant de leur préparation contre un tampon Tris-HCl, 5.10^{-2} M, pH 7,4, $MgCl_2$ 10^{-2} M, KCl 0,1 M ; D : Ribosomes (200 µg) reconstitués comme en C mais ayant subi une dialyse supplémentaire contre Tris-HCl 5.10^{-3} M, pH 7,4, $MgCl_2$ 10^{-4} M.

Souche utilisée : *E. coli* RNase I^-_{10}.

Gradients préparés dans Tris-HCl 5.10^{-3} M, pH 7,4, $MgCl_2$ 10^{-4} M (A, B, D) ou dans Tris-HCl 5.10^{-2} M, pH 7,4, $MgCl_2$ 10^{-2} M, KCl 0,1 M.

Centrifugation pendant 15 h à 20 000 t/min (A, C, D) ou à 25 000 t/min (B).

La dialyse des particules Li en suspension dans le surnageant résultant de leur préparation contre un tampon renfermant $MgCl_2$ 10^{-2} M et KCl 0,1 M provoque l'apparition de particules sédimentant à 28S et 47S

(fig. 10, C). On voit aussi sur le profil de sédimentation de la fig. 10, C que des traces de particules sédimentant vers 60-70S se sont formées dans ces conditions. Les particules 28S et 47S ne sont pas de simples produits d'associations entre particules 18S et 25S qui apparaîtraient en présence d'ions Mg^{++} 10^{-2} M, car une seconde dialyse contre un milieu contenant des ions Mg^{++} 10^{-4} ne les fait pas disparaître (fig. 10, D). Par contre, après cette seconde dialyse, les produits sédimentant vers 60-70S ne peuvent plus être mis en évidence.

La composition en protéine et en RNA des particules 28S-47S, isolées par sédimentation à 198 000 g, est indiquée dans le Tableau I. On voit qu'elle est peu différente de la composition des ribosomes de départ. On peut donc considérer ces particules comme de véritables ribosomes reconstitués, obtenus par réassociation complète entre particules Li et protéines solubilisées.

Deux points méritent néanmoins d'être soulignés :

1°) Les proportions relatives des ribosomes reconstitués 28S et 47S (fig. 10, C) ne sont pas identiques aux proportions des ribosomes 30S et 50S utilisés au départ (fig. 10, A) ou à celles des particules Li 18S et 25S (fig. 10, B). Ceci est dû à une perte sélective des particules 28S sous forme d'agrégats qui sédimentent au fond des tubes de centrifugation.

2°) Quoique le milieu de sédimentation utilisé dans l'expérience de la fig. 10, C soit propice à la formation de ribosomes 70S, on n'observe que de faibles quantités de produits sédimentant vers 60-70S. Ce comportement n'est pas sensiblement modifié si des ribosomes reconstitués 28S-47S sont dialysés à nouveau contre un milieu sans ions K^+ renfermant des ions Mg^{++} 10^{-2} M.

Discussion.

Les particules décrites dans le présent travail sont semblables par leur composition globale en RNA et en protéine et par leurs coefficients de sédimentation aux particules obtenues par Lerman et coll. [5] au cours du traitement des ribosomes par le chlorure de cesium concentré et aux particules accumulées par les bactéries incubées en présence de chloramphénicol [6]. Dans ces conditions, il serait tentant de penser qu'elles correspondent à des précurseurs normaux et que le traitement des ribosomes par des solutions concentrées de sels alcalins permet de remonter la chaîne des précurseurs en détachant des groupes spécifiques de protéines. Cependant la comparaison entre particules Li, particules Na et particules K amène à considérer avec prudence cette interprétation, dans la mesure où elle nous a permis de constater que si ces diverses particules diffèrent peu par leur composition globale et leurs coefficients de sédimentation, elles diffèrent beaucoup par leur teneur en RNA 5S. En l'absence d'arguments expérimentaux plus décisifs, il nous paraît donc prématuré de conclure à une correspondance exacte entre les divers types de particules.

Le fait que le détachement des protéines par LiCl 2 M ne s'effectue pas au hasard était suggéré par l'analyse chromatographique des protéines des particules Li sur colonne de CM-cellulose telle que nous l'avons décrite. Cette spécificité a été récemment établie par ATSMON et coll. [19], grâce à l'analyse de la composition en aminoacides et au fractionnement par électrophorèse sur gel d'amidon.

Les particules obtenues dans les expériences de reconstitution présentent une composition identique à celle des ribosomes de départ. Si leurs coefficients restent inférieurs à ceux des sous unités 30S et 50S, elles se comportent en cela comme les particules reconstituées après traitement au césium décrites par STAEHELIN et MESELSON [20] et par HOSOKAWA et coll. [21]. Il semble donc que les ribosomes ne retrouvent jamais exactement leur conformation initiale dans ce type d'expérience.

Ce travail a bénéficié entre autres du soutien de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (66 00 108) et du Commissariat à l'Energie Atomique et de l'U.S. Public Health Service (A - 4647).

Nous remercions le Dr W. GILBERT qui nous a aimablement fourni la souche RNase I^-_{10} d'*E. coli*.

SUMMARY.

When *Escherichia coli* ribosomes are suspended in a 2 M LiCl solution about 50 % of the ribosomal proteins and 70-80 % of 5S RNA are eliminated, with the formation of particles which sediment at about 18S and 25S. By dialysis of these particles after resuspension in the solution containing the solubilized proteins against 5.10^{-3} M Tri-HCl, pH 7,4, 10^{-2} M $MgCl_2$, 0,1 M KCl, the solubilized proteins and the particles reassociate with the formation of products which sediment at 28S and 47S.

ZUSAMMENFASSUNG.

Die Behandlung der Ribosomen von *Escherichia coli* durch eine Lösung LiCl 2 M beseitigt ungefähr 50 % der Ribosomenproteine und 70-80 % der RNA 5S und ergibt Partikeln, welche in der Nähe von 18S und 25S sedimentieren. Wenn man die Partikeln, welche in der Lösung, die die gelösten Proteine enthält, wieder suspendiert worden sind, gegen Tris-HCl 5.10^{-3} M, pH 7,4, MgCl 10^{-2} M, KCl 0,1 M dialysiert, so erhält man eine Wiedervereinigung der gelösten Proteinen und der Partikeln mit Bildung von Produkten, die bei 28S und 47S sedimentieren.

BIBLIOGRAPHIE.

1. BRITTEN, R. J., MCCARTHY, B. J. et ROBERTS, R. B. — *Biophys. J.*, 1962, **2**, 83.
2. KONO, M. et OSAWA, S. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, **87**, 326.
3. TISSIÈRES, A., WATSON, J. D., SCHLESSINGER, D. et HOLLINGWORTH, B. — *J. Mol. Biol.*, 1959, **1**, 221.
4. MESELSON, M., NOMURA, M., BRENNER, S., DAVERN, C. et SCHLESSINGER, D. — *J. Mol. Biol.*, 1964, **9**, 696.
5. LERMAN, M. I., SPIRIN, A. S., GAVRILOVA, L. P. et GOLOV, V. F. — *J. Mol. Biol.*, 1966, **15**, 268.
6. NOMURA, M. et WATSON, J. D. — *J. Mol. Biol.*, 1959, **1**, 204.
7. MARCOT-QUEIROZ, J. et MONIER, R. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1966, **48**, 446.

8. Gesteland, R. F. — *J. Mol. Biol.*, 1966, **16**, 67.
9. Marcot-Queiroz, J. et Monier, R. — *J. Mol. Biol.*, 1965, **14**, 490.
10. Cohen, G. N. et Rickenberg, H. N. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 693.
11. Keller, P. J., Cohen, E. et Neurath, H. — *J. Biol. Chem.*, 1958, **223**, 1517.
12. Marcot-Queiroz, J. et Monier, R. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1966, **48**, 37.
13. Dische, Z. — *Z. Mikrochemie*, 1930, **8**, 4.
14. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J. R., Farr, A. L. et Randall, R. J. — *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 265.
15. Mandell, J. D. et Hershey, A. D. — *Analyt. Biochem.*, 1960, **1**, 66.
16. Rosset, R., Monier, R. et Julien, J. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1964, **46**, 87.
17. Spitnick-Elson, P. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1965, **18**, 557.
18. Waller, J. P. — *J. Mol. Biol.*, 1964, **10**, 319.
19. Atsmon, A., Spitnick-Elson, P. et Elson, D. — Communication personnelle.
20. Saehelin, T. et Meselson, M. — *J. Mol. Biol.*, 1966, **15**, 245.
21. Hosokawa, K., Fujimura, R. et Nomura, M. — *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 1966, **55**, 198.

IMPRIMERIE M. DECLUME, LONS-LE-SAUNIER.